

**MEMBER FOR FORMING JOINT CARTILAGE AND METHOD OF
MANUFACTURING THE MEMBER, METHOD OF REGENERATING OR FORMING
AND CULTURING THE JOINT CARTILAGE, AND ARTIFICIAL JOINT CARTILAGE
FOR TRANSPLANTATION**

Publication number: JP2003325657

Publication date: 2003-11-18

Inventor: YOSHIKAWA HIDEKI

Applicant: YOSHIKAWA HIDEKI; TOSHIBA CERAMICS CO; MMT
KK

Classification:

- International: **A61L27/00; A61L27/00;** (IPC1-7): A61L27/00

- European:

Application number: JP20020137202 20020513

Priority number(s): JP20020137202 20020513

Report a data error here

Abstract of JP2003325657

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a member for forming a joint cartilage allowing the joint cartilage to be formed and regenerated and allowing the joint cartilage to be formed to a practicable level and a method of manufacturing the member, a method of regenerating or forming and culturing the joint cartilage in a living body or on the outside of the living body, and an artificial joint cartilage for transplantation provided by these methods.

SOLUTION: In this member for forming joint cartilage, a plurality of adjacent pores form three-dimensionally communicated continuous sphere-like open pores in a frame wall part dividing the pores. Bioabsorbable members and bone forming factors are carried on the inside surfaces of the pores in a ceramics porous body having a porous volume of 5 [μ]m or more in pore diameter in a fine pore diameter distribution measured with a mercury porosity meter of 85% or more of the total pore volume.
COPYRIGHT: (C)2004,JPO

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-325657

(P2003-325657A)

(43) 公開日 平成15年11月18日 (2003. 11. 18)

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	データベース (参考)
A 6 1 L 27/00	Z B P	A 6 1 L 27/00	Z B P C 4 C 0 8 1
			H
			J

審査請求 未請求 請求項の数44 ○L (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願2002-137202 (P2002-137202)

(22) 出願日 平成14年5月13日 (2002. 5. 13)

(71) 出願人 500103823

吉川 秀樹

大阪府豊中市少路2-111-1-605

(71) 出願人 000221122

東芝セラミックス株式会社

東京都新宿区西新宿七丁目5番25号

(71) 出願人 500097119

株式会社エム・エム・ティ

大阪市中央区谷町5丁目3番17号

(74) 代理人 100101878

弁理士 木下 茂

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 関節軟骨形成用部材およびその製造方法、関節軟骨の再生または形成方法および培養方法ならびに移植用人工関節軟骨

(57) 【要約】

【課題】 関節軟骨の形成および再生を可能とし、実用レベルまでの関節軟骨の形成を可能とする関節軟骨形成用部材およびその製造方法を提供する。また、生体内または生体外における関節軟骨の再生または形成方法および培養方法を提供し、さらに、これらの方法により得られる移植用人工関節軟骨を提供する。

【解決手段】 複数の隣接する気孔が、該気孔を区画する骨格壁部において3次元的に連通した連球状開気孔を形成し、水銀ポロシメータにより測定した細孔径分布における孔径5μm以上の気孔体積が、全気孔体積の85%以上であるセラミックス多孔体の気孔内表面に、生体吸収性部材および骨形成因子が担持されていることを特徴とする関節軟骨形成用部材を用いる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 複数の隣接する気孔が、該気孔を区画する骨格壁部において3次的に連通した連球状開気孔を形成し、水銀ポロシメータにより測定した細孔径分布における孔径 $5\mu\text{m}$ 以上の気孔体積が、全気孔体積の85%以上であるセラミックス多孔体の気孔内表面に、生体吸収性部材および骨形成因子が担持されていることを特徴とする関節軟骨形成用部材。

【請求項2】 前記骨形成因子は、骨誘導因子(BMP)、形質転換成長因子(TGF- β)、骨形成誘導因子(OLF)、インスリン様成長因子(IGF)、血小板由来成長因子(PDGF)および繊維芽細胞増殖因子(FGF)から選ばれたいずれかであることを特徴とする請求項1記載の関節軟骨形成用部材。

【請求項3】 前記骨形成因子は、ヒト骨誘導因子(hBMP)であることを特徴とする請求項1記載の関節軟骨形成用部材。

【請求項4】 前記ヒト骨誘導因子は、組換えヒト骨誘導因子(rhBMP)であることを特徴とする請求項3記載の関節軟骨形成用部材。

【請求項5】 前記rhBMPは、rhBMP-2またはrhBMP-7であることを特徴とする請求項4記載の関節軟骨形成用部材。

【請求項6】 前記rhBMPは、rhBMP-2であることを特徴とする請求項4記載の関節軟骨形成用部材。

【請求項7】 前記骨形成因子は、生体吸収性部材中に均一に混在していることを特徴とする請求項1から請求項6までのいずれかに記載の関節軟骨形成用部材。

【請求項8】 前記セラミックス多孔体の気孔は、攪拌起泡により形成されたものであることを特徴とする請求項1から請求項7までのいずれかに記載の関節軟骨形成用部材。

【請求項9】 前記セラミックス多孔体は、気孔率が50%以上90%以下であり、かつ、平均気孔径が $100\mu\text{m}$ 以上 $600\mu\text{m}$ 以下であることを特徴とする請求項1から請求項8までのいずれかに記載の関節軟骨形成用部材。

【請求項10】 前記セラミックス多孔体は、前記連球状開気孔の連通部分の平均孔径が $20\mu\text{m}$ 以上であることを特徴とする請求項1から請求項9までのいずれかに記載の関節軟骨形成用部材。

【請求項11】 前記セラミックス多孔体は、アルミナ、ジルコニア、シリカ、ムライト、ディオプサイド、ウォラストナイト、エーライト、ベライト、アーケルマナイト、モンティセライト、生体用ガラスおよびリン酸カルシウム系セラミックスから選ばれた少なくとも1種からなることを特徴とする請求項1から請求項10までのいずれかに記載の関節軟骨形成用部材。

【請求項12】 前記リン酸カルシウム系セラミックス

は、ハイドロキシアパタイト、リン酸三カルシウム、フッ化アパタイトから選ばれた少なくとも1種からなることを特徴とする請求項11記載の関節軟骨形成用部材。

【請求項13】 前記リン酸カルシウム系セラミックスは、ハイドロキシアパタイトからなることを特徴とする請求項12記載の関節軟骨形成用部材。

【請求項14】 前記生体吸収性部材は、骨形成因子の徐放性を備えていることを特徴とする請求項1から請求項13までのいずれかに記載の関節軟骨形成用部材。

【請求項15】 前記生体吸収性部材は、有機化合物からなることを特徴とする請求項1から請求項14までのいずれかに記載の関節軟骨形成用部材。

【請求項16】 前記生体吸収性部材は、乳酸および／またはグリコール酸の重合体、乳酸および／またはグリコール酸の重合体とポリエチレングリコールとのブロック共重合体、乳酸および／またはグリコール酸とp-ジオキサノンとポリエチレングリコールとの共重合体、アテロコラーゲンから選ばれた少なくとも1種からなることを特徴とする請求項1から請求項15までのいずれかに記載の関節軟骨形成用部材。

【請求項17】 前記生体吸収性部材は、ポリ乳酸とポリエチレングリコールとのブロック共重合体であることを特徴とする請求項1から請求項15までのいずれかに記載の関節軟骨形成用部材。

【請求項18】 前記ポリ乳酸とポリエチレングリコールとのブロック共重合体は、ポリ乳酸の数平均分子量が400以上5000以下であり、ポリエチレングリコールの数平均分子量が150以上2000以下であることを特徴とする請求項17記載の関節軟骨形成用部材。

【請求項19】 前記生体吸収性部材は、乳酸および／またはグリコール酸とp-ジオキサノンとポリエチレングリコールとの共重合体であることを特徴とする請求項1から請求項15までのいずれかに記載の関節軟骨形成用部材。

【請求項20】 生体吸収性材料を溶媒または分散媒に添加した後、骨形成因子と混合して、混合液を調製する工程と、

複数の隣接する気孔が、該気孔を区画する骨格壁部において3次的に連通した連球状開気孔を形成しているセラミックス多孔体に、前記混合液を浸潤させる工程と、前記セラミックス多孔体中の溶媒または分散媒を除去し、生体吸収性部材および骨形成因子をセラミックス多孔体の気孔内表面に担持させて、関節軟骨形成用部材を得る工程とを具備していることを特徴とする関節軟骨形成用部材の製造方法。

【請求項21】 前記セラミックス多孔体には、気孔が攪拌起泡により形成されたものを用いることを特徴とする請求項20記載の関節軟骨形成用部材の製造方法。

【請求項22】 前記混合液の調製工程においては、生体吸収性部材が有機化合物であって、溶媒または分散媒

としてアセトンを用いることを特徴とする請求項20または請求項21記載の関節軟骨形成用部材の製造方法。

【請求項23】 骨形成因子が含まれ、その徐放性を備えた部材を、関節面に配置し、固定することを特徴とする関節軟骨の再生または形成方法。

【請求項24】 骨形成因子が含まれ、その徐放性を備えた前記部材として、多孔質の生体吸収性部材を用いることを特徴とする請求項23記載の関節軟骨の再生または形成方法。

【請求項25】 骨形成因子が含まれ、その徐放性を備えた前記部材の少なくとも一部を関節液と接触させることを特徴とする請求項23または請求項24記載の関節軟骨の再生または形成方法。

【請求項26】 生体吸収性部材および骨形成因子を気孔内表面に担持しているセラミックス多孔体を、関節面に埋設させて、関節面に関節軟骨を再生または形成させることを特徴とする関節軟骨の再生または形成方法。

【請求項27】 前記セラミックス多孔体を関節面に埋設させた後、該セラミックス多孔体の少なくとも一部を関節液と接触させて、関節軟骨を再生または形成させることを特徴とする請求項26記載の関節軟骨の再生または形成方法。

【請求項28】 生体吸収性部材および骨形成因子を気孔内表面に担持している前記セラミックス多孔体には、請求項1から請求項19までのいずれかに記載の関節軟骨形成用部材を用いることを特徴とする請求項26または請求項27記載の関節軟骨の再生または形成方法。

【請求項29】 前記関節軟骨は、400 μ m以上の均等な厚さとなるように成長させることを特徴とする請求項23から請求項28までのいずれかに記載の関節軟骨の再生または形成方法。

【請求項30】 骨形成因子が含まれ、その徐放性を備えた部材を、軟骨になり得る細胞に接してまたは近傍に配置し、前記部材の少なくとも一部を関節液に接触させて、関節軟骨を培養することを特徴とする関節軟骨の培養方法。

【請求項31】 骨形成因子が含まれ、その徐放性を備えた前記部材として、多孔質の生体吸収性部材を用いることを特徴とする請求項30記載の関節軟骨の培養方法。

【請求項32】 生体吸収性部材および骨形成因子を気孔内表面に担持しているセラミックス多孔体を、軟骨になり得る細胞に接してまたは近傍に配置し、前記セラミックス多孔体の少なくとも一部を関節液に接触させて、関節軟骨を培養することを特徴とする関節軟骨の培養方法。

【請求項33】 生体吸収性部材および骨形成因子を気孔内表面に担持しているセラミックス多孔体の気孔内に、軟骨になり得る細胞を導入し、前記セラミックス多孔体の少なくとも一部を関節液に接触させて、関節軟骨

を培養することを特徴とする関節軟骨の培養方法。

【請求項34】 前記軟骨になり得る細胞は、間葉系幹細胞であることを特徴とする請求項30から請求項33までのいずれかに記載の関節軟骨の培養方法。

【請求項35】 生体吸収性部材および骨形成因子を気孔内表面に担持しているセラミックス多孔体の気孔内表面の少なくとも一部に、骨を形成させた後、さらに、前記セラミックス多孔体の表面の少なくとも一部に、請求項32から請求項34までのいずれかに記載された方法により関節軟骨を培養することを特徴とする関節軟骨の培養方法。

【請求項36】 生体吸収性部材および骨形成因子を気孔内表面に担持している前記セラミックス多孔体には、請求項1から請求項19までのいずれかに記載の関節軟骨形成用部材を用いることを特徴とする請求項32から請求項35までのいずれかに記載の関節軟骨の培養方法。

【請求項37】 前記関節軟骨は、400 μ m以上の均等な厚さとなるように培養されることを特徴とする請求項30から請求項36までのいずれかに記載の関節軟骨の培養方法。

【請求項38】 生体吸収性部材および骨形成因子を気孔内表面に担持しているセラミックス多孔体の表面の少なくとも一部に、関節軟骨が形成されていることを特徴とする移植用人工関節軟骨。

【請求項39】 前記関節軟骨は、400 μ m以上の均等な厚さであることを特徴とする請求項38記載の移植用人工関節軟骨。

【請求項40】 前記セラミックス多孔体の気孔内に、骨細胞が定着して形成された骨の表面の少なくとも一部に、軟骨細胞層が形成されていることを特徴とする請求項38または請求項39記載の移植用人工関節軟骨。

【請求項41】 前記セラミックス多孔体の気孔内に、骨細胞が定着して形成された骨の表面の少なくとも一部に、セラミックス多孔体を含まない骨細胞層が形成され、さらに、該骨細胞層の表面の少なくとも一部に、軟骨細胞層が形成されていることを特徴とする請求項38から請求項40までのいずれかに記載の移植用人工関節軟骨。

【請求項42】 生体吸収性部材および骨形成因子を気孔内表面に担持している前記セラミックス多孔体は、請求項1から請求項19までのいずれかに記載の関節軟骨形成用部材であることを特徴とする請求項38から請求項41までのいずれかに記載の移植用人工関節軟骨。

【請求項43】 生体内の関節軟骨または生体から採取した関節軟骨に接してまたは近傍に、骨形成因子を徐放させることを特徴とする関節軟骨の再生もしくは形成方法または培養方法。

【請求項44】 前記骨形成因子は、関節液の存在下に徐放されることを特徴とする請求項43記載の関節軟骨

の再生もしくは形成方法または培養方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、関節軟骨形成用部材およびその製造方法、関節軟骨の再生または形成方法および培養方法ならびに移植用人工関節軟骨に関し、より詳細には、関節部特有の軟骨を形成および再生することが可能な部材およびその製造方法、ならびに、生体内または生体外において関節軟骨を再生または形成する方法、関節軟骨を培養する方法、ならびに、セラミックス多孔体を基材として用いた移植用人工関節軟骨に関する。

【0002】

【従来の技術】関節は、骨と骨とが可動結合している連結部であり、この連結部におけるお互いの骨端の表面（関節面）は、関節軟骨により覆われている。そして、お互いの骨端の骨膜は、一体となって連結部を包むように関節包を形成している。この関節包に覆われた骨と骨との間には、関節腔と呼ばれる空間が形成されており、その内部は、関節液により満たされている。

【0003】前記関節面に形成されている軟骨は、通常、人間の膝関節においては厚さが約2mmであり、外傷や疾病等により、1～4mm²程度損傷した場合には、自然治癒により再生の可能性があるが、20mm²も損傷した場合には、自力での再生は困難である。さらに、腫瘍、壊死等の種々の原因により、関節軟骨を完全に失ったような場合には、関節機能を復元するため、例えば、人工関節を当該箇所に埋め込む等の処置が施されている。

【0004】しかしながら、人工関節は、あくまでも関節機能に類似して人工的に構成されたものであり、生体にとっては異物であるため、生体適合性を維持するのは困難である。また、人工関節は、生体内での厳しい環境下で、複雑な動作を要求されるため、20年以上維持させることは困難であり、その素材として用いられている樹脂や金属等の劣化や磨耗粉等により、機能の低下や苦痛を引き起こす場合もあり、耐久性においても十分であるとは言えなかった。

【0005】したがって、人工関節治療に替わるものとして、関節軟骨自体を再生する技術が要望されている。また、軟骨自体が形成されにくい軟骨形成不全の治療においても、関節軟骨を人工素材によらず、生体組織として形成および再生する技術が要望されている。

【0006】軟骨を形成する技術については、いくつかの提案がされているが、これらはいずれも、通常の骨が形成される骨化の過程において前段階にある軟骨が、骨の隙間に点在する程度のものであった。例えば、特開平7-88174号公報には、アテロコラーゲンをを用いた移植体により、骨膜性の連続した、骨・軟骨を含む仮骨様の骨性隆起が形成されたことが開示されている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上記移植体においては、仮骨様の骨性隆起とあるように、その軟骨量は十分であるとは言えず、関節として実用可能な連続性、厚さおよび量を有するものではなかった。上記のように、従来は、関節軟骨として、膜状または層状に連続して軟骨が形成された例はなく、実用化を図るためには、このような軟骨を十分な量で連続して得ることができる技術の開発が求められていた。

【0008】本発明は、上記技術的課題を解決するためになされたものであり、関節軟骨の形成および再生を可能とし、実用レベルまでの関節軟骨の形成を可能とする関節軟骨形成用部材およびその製造方法を提供することを目的とするものである。また、本発明の他の目的は、生体内または生体外における関節軟骨の再生または形成方法および培養方法を提供し、さらに、これらの方法により得られる移植用人工関節軟骨を提供することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明に係る関節軟骨形成用部材は、複数の隣接する気孔が、該気孔を区画する骨格壁部において3次元的に連通した連球状開気孔を形成し、水銀ボロシメータにより測定した細孔径分布における孔径5μm以上の気孔体積が、全気孔体積の85%以上であるセラミックス多孔体の気孔内表面に、生体吸収性部材および骨形成因子が担持されていることを特徴とする。

【0010】前記骨形成因子は、骨誘導因子（BMP: bone morphogenetic protein）、形質転換成長因子（TGF-β: transforming growth factor β）、骨形成誘導因子（OIF: osteoinductive factor）、インスリン様成長因子（IGF: insulin derived growth factor）、血小板由来成長因子（PDGF: platelet derived growth factor）および繊維芽細胞増殖因子（FGF: fibroblast growth factor）から選ばれたいずれかであることが好ましい。

【0011】前記関節軟骨形成用部材を人体に適用するためには、前記骨形成因子は、特に、ヒト骨誘導因子（hBMP）であることが好ましく、遺伝子組換え技術により得られた組換えヒト骨誘導因子（rhBMP）であることがより好ましい。さらに、前記rhBMPとしては、rhBMP-2またはrhBMP-7であることが好ましく、特に、rhBMP-2であることが好ましい。

【0012】これらの骨形成因子は、生体吸収性部材中に均一に混在していることが好ましい。

【0013】また、前記セラミックス多孔体の気孔は、

攪拌起泡により形成されたものであり、その気孔率は50%以上90%以下であり、かつ、平均気孔径は100 μ m以上600 μ m以下であることが好ましい。また、前記セラミックス多孔体の連球状開気孔の連通部分の平均気孔径は20 μ m以上であることが好ましい。

【0014】さらに、前記セラミックス多孔体は、アルミナ、ジルコニア、シリカ、ムライト、ディオプサイド、ウォラストナイト、エーライト、ペライト、アーケルマナイト、モンティセライト、生体用ガラスおよびリン酸カルシウム系セラミックスから選ばれた少なくとも1種からなることが好ましい。これらの中でも、リン酸カルシウム系セラミックスが好ましく、このリン酸カルシウム系セラミックスとしては、ハイドロキシアパタイト、リン酸三カルシウム、フッ化アパタイトが挙げられるが、本発明においては、特に、ハイドロキシアパタイトからなることが好ましい。

【0015】また、前記生体吸収性部材は、骨形成因子の徐放性を備えていることが好ましく、このような特性を備えた材料として、有機化合物、例えば、乳酸および／またはグリコール酸の重合体、乳酸および／またはグリコール酸の重合体とポリエチレングリコールとのブロック共重合体、乳酸および／またはグリコール酸とp-ジオキサノンとポリエチレングリコールとの共重合体、アテロコラーゲンが好適に用いられる。この中でも、特に、数平均分子量が400以上5000以下のポリ乳酸と数平均分子量が150以上20000以下であるポリエチレングリコールとのブロック共重合体(PLA-P EG)が好ましい。また、乳酸および／またはグリコール酸とp-ジオキサノンとポリエチレングリコールとの共重合体(PLA-DX-P EG)も、同様に好適に用いることができる。

【0016】また、本発明に係る関節軟骨形成用部材の製造方法は、生体吸収性材料を溶媒または分散媒に添加した後、骨形成因子と混合して、混合液を調製する工程と、複数の隣接する気孔が、該気孔を区画する骨格壁部において3次的に連通した連球状開気孔を形成しているセラミックス多孔体に、前記混合液を浸潤させる工程と、前記セラミックス多孔体中の溶媒または分散媒を除去し、生体吸収性部材および骨形成因子をセラミックス多孔体の気孔内表面に担持させて、関節軟骨形成用部材を得る工程とを具備していることを特徴とする。

【0017】上記製造方法においては、前記セラミックス多孔体には、気孔が攪拌起泡により形成されたものを用い、また、前記混合液の調製工程においては、生体吸収性部材が有機化合物である場合、溶媒または分散媒としてアセトンを用いることが好ましい。

【0018】また、本発明に係る関節軟骨の再生または形成方法は、骨形成因子が含まれ、その徐放性を備えた部材を、関節面に配置し、固定することを特徴とするものである。ここで、骨形成因子が含まれ、その徐放性を

備えた前記部材としては、多孔質の生体吸収性部材が用いられることが好ましい。また、前記部材は、少なくともその一部を関節液と接触させることが好ましい。

【0019】また、生体吸収性部材および骨形成因子を気孔内表面に担持しているセラミックス多孔体を、関節面に埋設させて、関節面に関節軟骨を固定することにより、関節軟骨を再生または形成することもできる。このとき、前記セラミックス多孔体を関節面に埋設させた後、該セラミックス多孔体の少なくとも一部を関節液と接触させることが好ましい。

【0020】上記関節軟骨の再生または形成方法において用いられる生体吸収性部材および骨形成因子を気孔内表面に担持している前記セラミックス多孔体には、上記したような本発明に係る関節軟骨形成用部材を好適に用いることができる。また、前記関節軟骨は、400 μ m以上の均等な厚さとなるように成長させることが好ましい。

【0021】また、本発明に係る関節軟骨の培養方法は、骨形成因子が含まれ、その徐放性を備えた部材を、軟骨になり得る細胞に接してまたは近傍に配置し、前記部材の少なくとも一部を関節液に接触させて、関節軟骨を培養することを特徴とする。上記培養方法においても、骨形成因子が含まれ、その徐放性を備えた前記部材として、多孔質の生体吸収性部材を用いることが好ましい。

【0022】また、生体吸収性部材および骨形成因子を気孔内表面に担持しているセラミックス多孔体を、軟骨になり得る細胞に接してまたは近傍に配置し、または、セラミックス多孔体の気孔内に、軟骨になり得る細胞を導入し、前記セラミックス多孔体の少なくとも一部を関節液に接触させて、関節軟骨を培養することもできる。ここで、上記の軟骨になり得る細胞としては、間葉系幹細胞が好ましい。

【0023】さらにまた、生体吸収性部材および骨形成因子を気孔内表面に担持しているセラミックス多孔体の気孔内表面の少なくとも一部に、骨を形成させた後、さらに前記セラミックス多孔体の表面の少なくとも一部に、上記培養方法により関節軟骨を培養することもできる。

【0024】上記培養方法においては、生体吸収性部材および骨形成因子を気孔内表面に担持している前記セラミックス多孔体として、上記した本発明に係る関節軟骨形成用部材を好適に用いることができ、また、前記関節軟骨は、400 μ m以上の均等な厚さとなるように培養されることが好ましい。

【0025】また、本発明に係る移植用人工関節軟骨は、生体吸収性部材および骨形成因子を気孔内表面に担持しているセラミックス多孔体の表面の少なくとも一部に、関節軟骨が形成されていることを特徴とするものである。前記移植用人工関節軟骨においては、関節軟骨は

400 μm 以上の均等な厚さであることが好ましい。

【0026】また、前記移植用人工関節軟骨は、前記セラミックス多孔体の気孔内に、骨細胞が定着して形成された骨の表面の少なくとも一部に、軟骨細胞層が形成されている、または、前記セラミックス多孔体の気孔内に、骨細胞が定着して形成された骨の表面の少なくとも一部に、セラミックス多孔体を含まない骨細胞層が形成され、さらに、該骨細胞層の表面の少なくとも一部に、軟骨細胞層が形成されていることが好ましい。ここで、生体吸収性部材および骨形成因子を気孔内表面に担持している前記セラミックス多孔体としては、上記した本発明に係る関節軟骨形成用部材を好適に用いることができる。

【0027】さらにまた、本発明に係る関節軟骨の再生もしくは形成方法または培養方法は、生体内の関節軟骨または生体から採取した関節軟骨に接してまたは近傍に、骨形成因子を徐放させることを特徴とする。このとき、前記骨形成因子は、関節液の存在下に徐放されることが好ましい。

【0028】

【発明の実施の形態】以下、本発明を、より詳細に説明する。本発明に係る関節軟骨形成用部材は、複数の隣接する気孔が、該気孔を区画する骨格壁部において3次元的に連通した連球状開気孔を形成し、水銀ポロシメータにより測定した細孔径分布における孔径5 μm 以上の気孔体積が、全気孔体積の85%以上であるセラミックス多孔体を基材とし、前記基材の気孔内表面に、生体吸収性部材および骨形成因子が担持されているものである。

【0029】前記骨形成因子としては、骨組織中からの抽出成分である各種の骨形成関連タンパク質を用いることができる。例えば、骨誘導因子(BMP: bone morphogenetic protein)、形質転換成長因子(TGF- β : transforming growth factor β)、骨形成誘導因子(OIF: osteoinductive factor)、インスリン様成長因子(IGF: insulin derived growth factor)、血小板由来成長因子(PDGF: platelet derived growth factor)および繊維芽細胞増殖因子(FGF: fibroblast growth factor)が挙げられる。

【0030】これらの骨形成因子の中でも、前記関節軟骨形成用部材を人体に適用するためには、ヒト由来の他のタンパク質が実質的に含まれていないヒト骨誘導因子(hBMP)であることが好ましい。特に、免疫性等の臨床上的安全性および品質の安定した材料の大量入手が可能である等の点から、遺伝子組換え技術により得られた組換えヒト骨誘導因子(rhBMP)であることが好ましい。すなわち、ヒト骨誘導因子をコードする塩基配列を含む組換えDNAを含む細胞または微生物等の形質

転換体を培養し、それら形質転換体によって産出されたrhBMPを単離、精製して調製したものである。

【0031】これらのrhBMPとしては、例えば、rhBMP-2、rhBMP-3、rhBMP-4(rhBMP-2Bともいう)、rhBMP-5またはrhBMP-6、rhBMP-7 rhBMP-8、rhBMPのヘテロダイマーまたはこれらの改変体や一部損体が挙げられ、これらを単独で、または、2種以上の混合物として用いることができる。この中でも、軟骨の形成または再生のためには、rhBMP-2またはrhBMP-7の効果が大きいいため好ましく、特に、rhBMP-2であることが好ましい。

【0032】これらの骨形成因子は、部材全体での均等な関節軟骨形成を担保する観点から、生体吸収性部材中に均一に混在していることが好ましい。

【0033】前記骨形成因子が、骨形成作用を発現するためには、それが担持されるための基材が必要である。この基材として、本発明においては、複数の隣接する気孔が、該気孔を区画する骨格壁部において3次元的に連通した連球状開気孔を形成し、水銀ポロシメータにより測定した細孔径分布における孔径5 μm 以上の気孔体積が、全気孔体積の85%以上であるセラミックス多孔体を用いる。このような基材の構造により、骨格部が緻密で、全体として十分な強度を有しており、生体吸収性部材を長期間安定して支持することができる。しかも、気孔自体が平均して大きいため、前記気孔間に形成されている大きな連通部を通じて、細胞や体液が、迅速かつ効率よく、移動および循環することができる。また、前記基材は、個々の気孔形状は、ほぼ球状であり、気孔率が大きいにもかかわらず、この形状が崩れることなく維持されているため、その気孔内の表面積が大きく、生体吸収性部材および骨形成因子を、気孔内表面に高密度で担持することができる。

【0034】前記セラミックス多孔体は、骨の内部から軟骨形成部分までの細胞や栄養が導入されやすく、全体に行き届きやすい等の観点から、気孔率は50%以上90%以下であり、好ましくは、65%以上85%以下である。また、平均気孔径は100 μm 以上600 μm 以下であることが好ましい。なお、この平均気孔径は、樹脂包埋による方法で測定することができる。また、前記セラミックス多孔体の連球状開気孔の連通部分の平均孔径は20 μm 以上であることが好ましく、40 μm 以上であることがより好ましい。この連通部の平均孔径は、水銀ポロシメータ(水銀圧入法)により測定することができる。図5に、本発明に係るセラミックス多孔体であって、ハイドロキシアパタイト製のものについて、電子顕微鏡写真を示す。図5(a)は拡大倍率150倍、(b)は拡大倍率10,000倍のものである。また、図6に、水銀ポロシメータ(水銀圧入法)により測定した上記ハイドロキシアパタイト製のセラミックス多孔体

の細孔分布を示す。

【0035】上記気孔を有するセラミックス多孔体は、攪拌起泡により、容易に製造することができる。攪拌起泡により形成されたセラミックス多孔体は、気孔を区画する骨格壁部自体が緻密であり、気孔がほぼ球状となり、高強度を得られるため好ましい。具体的には、例えば、以下のような製造方法により、上記のようなセラミックス多孔体を得ることができる。材質がハイドロキシアパタイトである場合を例として説明する。まず、ハイドロキシアパタイト粉末に、架橋重合性樹脂としてポリエチレンイミン等を添加し、分散媒として水を用いて、混合、解砕し、スラリーを調製する。次に、このスラリーに起泡剤としてポリオキシエチレンラウリルエーテル等を添加し、攪拌して起泡させる。さらに、架橋剤としてソルビトールグリシジルエーテル等を添加し、得られた泡沫状スラリーを、注型して、泡構造を固定した状態で乾燥させた後、1100～1300℃程度で焼結させることにより、ハイドロキシアパタイト多孔体を得られる。

【0036】前記セラミックス多孔体は、生体為害性を有さず、かつ、十分な機械的強度を有する材質のセラミックスであることが好ましく、具体的には、アルミナ、ジルコニア、シリカ、ムライト、ディオプサイド、ウォラストナイト、エーライト、ベライト、アーケルマナイト、モンティセライト、生体用ガラスおよびリン酸カルシウム系セラミックスから選ばれた少なくとも1種からなることが好ましい。この中でも、生体適合性に優れていることから、リン酸カルシウム系セラミックスが好ましく、このリン酸カルシウム系セラミックスとしては、ハイドロキシアパタイト、リン酸三カルシウム、フッ化アパタイトが挙げられるが、本発明においては、特に、骨との同化性、癒着性、強度等の観点から、骨の主組成成分であるハイドロキシアパタイトからなることが好ましい。

【0037】前記骨形成因子を、数週間から十数週間の関節軟骨が再生または形成されるための適当な期間内において、徐々に放出させるためには、前記骨形成因子と複合させる生体吸収性部材が不可欠である。関節軟骨を形成しようとする部分に、骨形成因子を直接塗布した場合には、該骨形成因子はすぐに流出してしまい、軟骨は形成されない。したがって、骨形成因子と複合される生体吸収性材料としては、骨形成因子の徐放性を有しており、生体為害性がなく、生体内組織に徐々に吸収されながら、同時に骨形成因子を徐々に放出するものが好ましい。

【0038】このような特性を有する材料としては、リン酸三カルシウム等の無機材料でも可能であるが、生体吸収される時間の制御のしやすさ等の観点から、有機化合物が好ましい。有機化合物であれば、その分子量を調整することにより徐放期間を調整でき、さらに、基材で

あるセラミックス多孔体の気孔内に均一かつ広範囲に、骨形成因子を行き渡らせることができる。なお、菌等による感染を排除する観点から、合成により得られる有機化合物を用いることがより好ましい。また、必要に応じて、前記セラミックス多孔体の材質と同様のセラミックス成分等を添加してもよい。

【0039】前記生体吸収性材料としては、具体的には、疎水性および親水性の両性質を備えた高分子材料が好適に用いられる。例えば、乳酸および／またはグリコール酸の重合体、乳酸および／またはグリコール酸の重合体とポリエチレングリコールとのブロック共重合体、乳酸および／またはグリコール酸とp-ジオキサノンとポリエチレングリコールとの共重合体(PLA-DX-PEG)、アテロコラーゲン等が挙げられる。この中でも、特に、生体内組織への吸収速度および骨形成因子の放出速度、前記セラミックス多孔体への接着性、弾力性等の観点から、ポリ乳酸-ポリエチレングリコール共重合体(PLA-PEG)が好ましく、さらに、ポリ乳酸(PLA)の数平均分子量が400以上5000以下であり、ポリエチレングリコール(PEG)の数平均分子量が150以上20000以下であることが好ましい。全体としての数平均分子量は、9000以上9700以下であることがより好ましい。

【0040】また、同様の利点を有しながら、さらに、全体の分解時間がより好適に制御されているものとして、数平均分子量が5000以上20000以下、好ましくは、8000以上10000以下である、乳酸および／またはグリコール酸とp-ジオキサノンとポリエチレングリコールとの共重合体(PLA-DX-PEG)も好適に用いることができる。その数平均分子量は、8900以上9400以下であることがより好ましい。このPLA-DX-PEGは、共重合体中の乳酸および／またはグリコール酸とp-ジオキサノンとポリエチレングリコールの割合が、モル比で26～60：4～25：25～70であることが好ましい。このPLA-DX-PEGの具体的な製法については、例えば、特開2000-237297号公報に記載されているような方法等を用いることができる。

【0041】上記のような関節軟骨形成用部材は、生体吸収性材料を溶媒または分散媒に添加した後、骨形成因子と混合して、混合液を調製する工程と、複数の隣接する気孔が、該気孔を区画する骨格壁部において3次元的に連通した連球状開気孔を形成しているセラミックス多孔体に、前記混合液を浸潤させる工程と、前記セラミックス多孔体中の溶媒または分散媒を除去し、生体吸収性部材および骨形成因子をセラミックス多孔体の気孔内表面に担持させて、関節軟骨形成用部材を得る工程とを具備する製造方法により得ることができる。上記製造方法においては、前記セラミックス多孔体には、上述のように、気孔が攪拌起泡により形成されたものを用いること

が好ましい。

【0042】また、前記混合液の調製工程においては、溶媒または分散媒として、アセトン、塩化メチレン、クロロホルム、エタノール等を用いることが好ましく、特に、アセトンを用いることが好ましい。これらの溶媒または分散媒は、生体吸収性部材および骨形成因子をセラミックス多孔体の気孔内表面に、均等に担持させる役割を果たすものであり、その後、揮発、凍結乾燥または減圧乾燥等により除去可能であり、得られる関節軟骨形成用部材中には残存しないことが好ましい。

【0043】ところで、関節軟骨を再生もしくは形成または培養する場合には、①骨形成因子と関節液が接触できるようにすること、②骨形成因子が徐々に放出され、その効果を一定期間保持すること、③骨の内部から軟骨形成部まで細胞や体液等が十分供給され続けられるようにすることが必要であると考えられる。このような観点から、本発明においては、関節軟骨の再生または形成方法としては、骨形成因子が含まれ、骨形成因子の徐放性を備えた部材を、関節面に配置し、固定することを要する。例えば、患者自身の骨を足場として、その表面に、関節軟骨を形成させることができる。

【0044】骨形成因子が含まれ、その徐放性を備えた前記部材としては、多孔質の生体吸収性部材が用いられることが好ましい。生体吸収性部材が多孔質である場合、その多孔体自体が、連通する開気孔を多数有していることから、体液や細胞の導入が容易であるため、該生体吸収性部材を足場として、その表面等に関節軟骨を再生または形成させることが好ましい。この生体吸収性部材には、具体的には、上記したような材料を適用することができる。また、骨形成因子が含まれ、その徐放性を備えた前記部材は、その少なくとも一部を関節液と接触させることが好ましい。

【0045】また、生体吸収性部材および骨形成因子を気孔内表面に担持しているセラミックス多孔体を、関節面に埋設させて、関節面に関節軟骨を固定することにより、関節軟骨を再生または形成することもできる。このような方法によれば、関節軟骨の固定は容易となる。このとき、前記セラミックス多孔体は、隣接する関節軟骨表面よりもわずかに深い位置、すなわち、くぼんだ状態となるように埋設することが好ましい。このように配置させることにより、関節軟骨が再生または形成されるスペースを確保し、かつ、再生または形成される関節軟骨と、これに隣接する関節軟骨とを、隙間なく同化させることが可能となる。

【0046】関節液は、それ自体またはそれに含まれる特定成分が、骨形成因子とともに関節軟骨の再生または形成を促進させるものであると考えられる。すなわち、関節液には、関節軟骨修復維持物質が含まれている。したがって、上記のような骨形成因子が含まれ、その徐放性を備えた部材、または、生体吸収性部材および骨形成

因子を気孔内表面に担持しているセラミックス多孔体を用いた場合であっても、これらを関節液またはそれに含まれる特定成分と接触することがない部分に埋設しても、関節軟骨は形成されない。このため、前記セラミックス多孔体は、関節面に埋設させた後、該セラミックス多孔体の少なくとも一部を関節液と接触させることが好ましい。

【0047】上記のようにして再生または形成された関節軟骨は、関節の機能を十分に担保するためには、400 μ m以上、より好ましくは、500 μ m以上の均等な厚さに成長させることが好ましい。このように、連続した十分な量の関節軟骨を得るためには、上記した本発明に係る関節軟骨形成用部材を、上記再生または形成方法における生体吸収性部材および骨形成因子を気孔内表面に担持しているセラミックス多孔体として、好適に用いることができる。

【0048】また、本発明に係る関節軟骨の培養方法は、骨形成因子が含まれ、その徐放性を備えた部材を、軟骨になり得る細胞に接してまたは近傍に配置し、前記部材の少なくとも一部を関節液に接触させて、関節軟骨を培養することを特徴とする。このような方法により、自己の関節液を用いて、体外で関節軟骨を培養することも可能である。体外で培養した関節軟骨自体の移植は困難であるとされているが、同様に体外で培養した骨と一体化された状態で、または、体外培養した関節軟骨周辺に未分化細胞を配置する等の方法により、体外培養した関節軟骨を移植することも可能である。上記培養方法において、骨形成因子が含まれ、その徐放性を備えた前記部材としては、上記関節軟骨の再生または形成方法の場合と同様に、多孔質の生体吸収性部材を用いることが好ましい。

【0049】また、生体吸収性部材および骨形成因子を気孔内表面に担持しているセラミックス多孔体を、軟骨になり得る細胞に接してまたは近傍に配置し、または、セラミックス多孔体の気孔内に、軟骨になり得る細胞を導入し、前記セラミックス多孔体の少なくとも一部を関節液に接触させて、関節軟骨を培養することもできる。このように、培養する関節軟骨周辺に、軟骨になり得る細胞、すなわち、未分化細胞を配置することにより、体外培養した関節軟骨を移植することが可能となる。ここで、上記の軟骨になり得る細胞としては、間葉系幹細胞、軟骨細胞、遺伝子組換えにより軟骨細胞を形成する細胞等であれば、特に限定されないが、間葉系幹細胞がより好ましい。なお、上記培養方法においては、前記部材の少なくとも一部を関節液に接触させる際、関節腔内の環境に近づけるために、関節液を加圧してもよい。

【0050】さらにまた、生体吸収性部材および骨形成因子を気孔内表面に担持しているセラミックス多孔体の気孔内表面の少なくとも一部に、骨を形成させた後、さらにその表面の少なくとも一部に、上記培養方法により

関節軟骨を培養することもできる。このようにして、培養される関節軟骨の直下には、同様に培養された骨が一体化された状態で形成されていることにより、体外培養した関節軟骨を移植することも可能となる。

【0051】上記のようにして培養された関節軟骨は、関節の機能を十分に担保するためには、 $400\mu\text{m}$ 以上、より好ましくは、 $500\mu\text{m}$ 以上の均等な厚さであることが好ましい。このように、連続した十分な量の関節軟骨を得るためには、上記した本発明に係る関節軟骨形成用部材を、上記培養方法における生体吸収性部材および骨形成因子を気孔内表面に担持しているセラミックス多孔体として、好適に用いることができる。

【0052】また、本発明に係る移植用人工関節軟骨は、生体吸収性部材および骨形成因子を気孔内表面に担持しているセラミックス多孔体の表面の少なくとも一部に、関節軟骨が形成されていることを特徴とするものである。このような移植用人工関節軟骨は、上述したような関節軟骨の培養方法により得ることができる。

【0053】また、前記移植用人工関節軟骨は、前記セラミックス多孔体の気孔内に、骨細胞が定着して形成された骨の表面の少なくとも一部に、軟骨細胞層が形成されている、または、前記セラミックス多孔体の気孔内に、骨細胞が定着して形成された骨の表面の少なくとも一部に、セラミックス多孔体を含まない骨細胞層が形成され、さらに、該骨細胞層の表面の少なくとも一部に、軟骨細胞層が形成されていることが好ましい。上述したように、関節軟骨のみを体内に移植することは、骨との付着性等の観点から困難であることから、移植用人工関節軟骨においては、上記のように、軟骨細胞層が、その下面の骨または骨細胞と一体化されていることが好ましい。このとき、生体吸収性部材および骨形成因子を気孔内表面に担持している前記セラミックス多孔体として、上記した本発明に係る関節軟骨形成用部材を好適に用いることができる。

【0054】さらにまた、本発明に係る関節軟骨の再生もしくは形成方法または培養方法は、生体内の関節軟骨または生体から採取した関節軟骨に接してまたは近傍に、骨形成因子を徐放させることを特徴とする。既存の生体関節軟骨と一体的に関節軟骨層を形成することが好ましく、また、生体の軟骨細胞の活性化を図ることにより、関節軟骨の再生もしくは形成または培養を促すことができる。このとき、前記骨形成因子は、関節液の存在下に徐放されることが好ましい。

【0055】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づきさらに具体的に説明するが、本発明は下記の実施例により制限されるものではない。

【実施例1】DL-ラクチドとp-ジオキサノンとポリエチレングリコールとからなる数平均分子量9300の共重合体からなるPLA-DX-PEG (PLA:D

X:PEG=45:17:38 (モル比)) 100mgと、rhBMP-2を $20\mu\text{g}$ とを混合し、アセトンで希釈して、ゲル状混合物を作製した。このゲル状混合物を、攪拌起泡により製造したハイドロキシアパタイト製多孔体(直径4mm、長さ4mm、気孔率75%、気孔径 $200\mu\text{m}$)に浸潤させた後、しばらく放置し、アセトンを揮発させて、アパタイト多孔体の気孔内表面に、生体吸収性部材と骨形成因子との均一な混合層を形成させ、関節軟骨形成用部材を得た。得られた関節軟骨形成用部材を、その大きさに穿孔したウサギの大腿骨関節面に埋設した後、関節を元に戻し、さらに、切開部を縫合した。

【0056】3、6、12週間後、前記部材の埋設部分を表面から観察した。3週間後には、関節軟骨の再生はわずかであったが、6週間後には、外見上、ほぼ元どおりに再生されていた。さらに、12週間後には、完全に再生されていた。

【0057】6週間後の埋設部分の顕微鏡写真を図で表したものを図1、図2(a)および(b)に示す。図1において、A-A'間が、関節軟骨形成用部材を埋設した部分である。関節表面1の下層には、再生された間接軟骨2の層Xが形成されている。また、前記再生関節軟骨層Xと、セラミックス多孔体層Zとの間には、セラミックス多孔体を含まない、骨のみからなる層Yが存在している。なお、セラミックス多孔体の気孔内には、骨細胞入り込み、骨が再生されていることが確認された。図2(a)は、図1のA-A'間の一部の拡大写真を図示したものであり、図2(b)は、さらに、その上層部分の拡大写真を図示したものである。

【0058】図1に示したように、6週間後には、再生関節軟骨層Xが、厚さ約 $500\mu\text{m}$ (ウサギの正常な関節軟骨の約2/3)で形成されていることが確認された。また、図1、図2(a)のAおよびA'部分において、前記再生関節軟骨2は、本来の関節軟骨との境界が分からない程度に連続して形成されており、この付近の再生関節軟骨層X(Q部分)は、特に厚く形成されていることが認められた。なお、図2(b)に示したように、再生関節軟骨層2には、多数の軟骨細胞3が認められた。さらに、12週間後には、埋設部分(A-A'間)の区別がつかないほど回復していた。

【0059】[比較例1]骨形成因子を含有しないで、それ以外については、実施例1と同様にして、関節軟骨形成用部材を作製した。得られた関節軟骨形成用部材を、実施例1と同様にして、ウサギの大腿骨関節面に埋設し、3、6、12週間後、埋設部分を表面から観察した。3、6、12週間後において、骨は形成されているものの、関節軟骨の再生は認められなかった。

【0060】6週間後の埋設部分の顕微鏡写真を図で表したものを図3、図4(a)および(b)に示す。図3において、C-C'間が、関節軟骨形成用部材を埋設し

た部分である。図4(a)は、図3のC-C'間の一部の拡大写真を図示したものであり、図4(b)は、さらに、その上層部分の拡大写真を図示したものである。

【0061】図3に示したように、6週間後でも、埋設部分(C-C'間)と本来の関節軟骨の境界部分が、特にC'部分において、明らかに認められた。また、図4(b)に示したように、前記部材の埋設部分(C-C'間)には、繊維性軟骨4が確認されたが、関節軟骨の形成は認められなかった。なお、繊維性軟骨4は、2型コラーゲンの発現が認められなかったことにより、関節軟骨ではないことを確認した。さらに、12週間後においても、関節軟骨は形成されていなかった。

【0062】【比較例2】実施例1と同様にして作製した関節軟骨形成用部材を、ウサギの大腿骨側面に埋設し、3、6、12週間後、埋設部分を観察した。その結果、6週間後、骨の再生は認められたが、その表面に、軟骨は形成されていなかった。

【0063】上記のように、本発明に係る骨形成因子が担持された関節軟骨形成用部材を用いた場合(実施例1)、骨形成因子が担持されていない場合(比較例1)と異なり、十分な量で連続して関節軟骨が形成されることが認められた。また、骨形成因子が担持された関節軟骨形成用部材を、関節液と接触させた場合(実施例1)には、関節軟骨が形成されたが、関節液と接触しない場合(比較例2)には、関節軟骨は形成されないことが認められた。

【0064】

【発明の効果】本発明に係る関節軟骨形成用部材を用いることにより、関節軟骨の形成および再生を自然に近い状態で行うことができ、実用レベルの関節軟骨の形成が可能となる。また、本発明に係る関節軟骨の再生または形成方法および培養方法を用いれば、生体内または生体外においても、周辺の既存の関節軟骨との同化および骨

との一体化も良好であり、連続した十分な量の関節軟骨を得ることができる。さらに、これらの方法により得られる本発明に係る移植用人工関節軟骨を用いれば、生体適合性および定着性に優れているため、従来の人工関節治療に替わって、人工関節軟骨を移植することが可能となり、患者の苦痛や負担を軽減することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1における6週間後の関節軟骨形成用部材の埋設部分の顕微鏡写真を図示したものである。

【図2】(a)は、図1のA-A'間の一部の拡大写真を図示したものであり、(b)は、(a)の上層部分の拡大写真を図示したものである。

【図3】比較例1における6週間後の関節軟骨形成用部材の埋設部分の顕微鏡写真を図示したものである。

【図4】(a)は、図3のC'部分付近の拡大写真を図示したものであり、(b)は、(a)の上層部分の拡大写真を図示したものである。

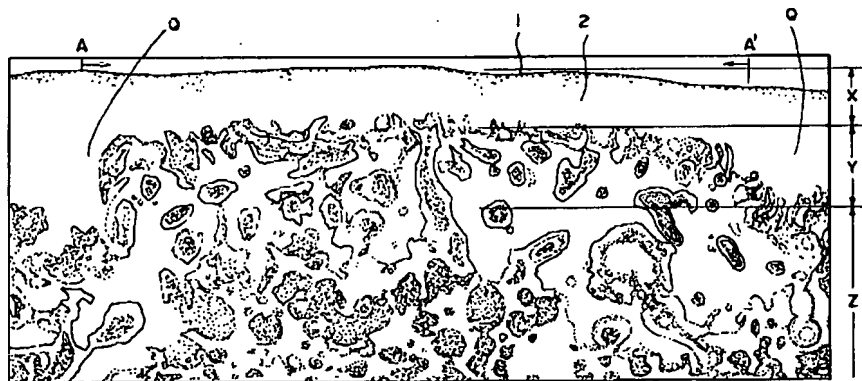
【図5】本発明に係るハイドロキシアパタイト製セラミックス多孔体の電子顕微鏡写真を示したものであり、(a)は拡大倍率150倍、(b)は拡大倍率10,000倍である。

【図6】図5に示したセラミックス多孔体の水銀ポロシメータ(水銀圧入法)による細孔分布を示したものである。

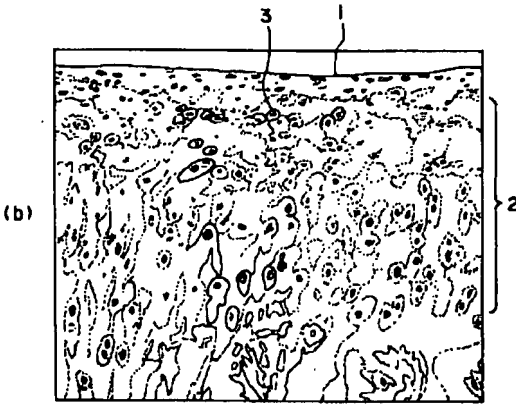
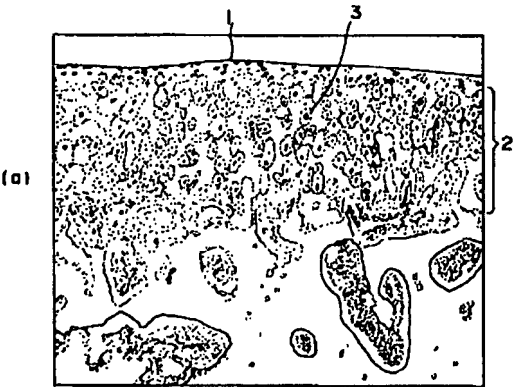
【符号の説明】

- | | |
|------|------------|
| 1、1' | 関節表面 |
| 2 | 再生関節軟骨 |
| 3 | 軟骨細胞 |
| 4 | 繊維状軟骨 |
| X | 再生関節軟骨層 |
| Y | 骨の層 |
| Z | セラミックス多孔体層 |

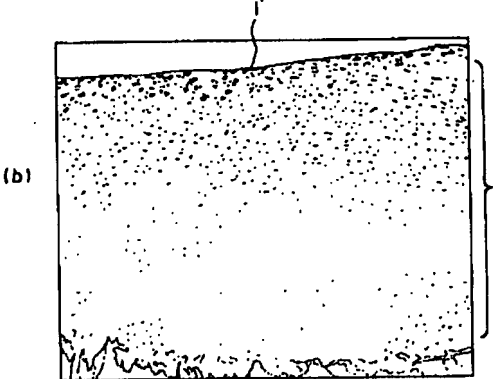
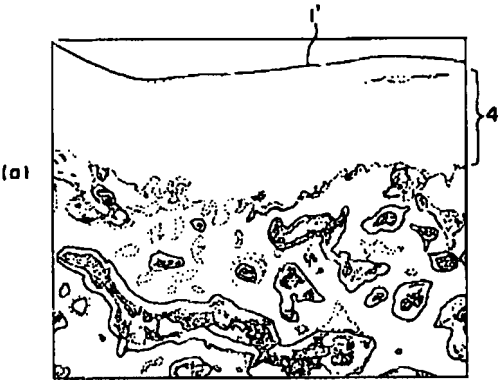
【図1】



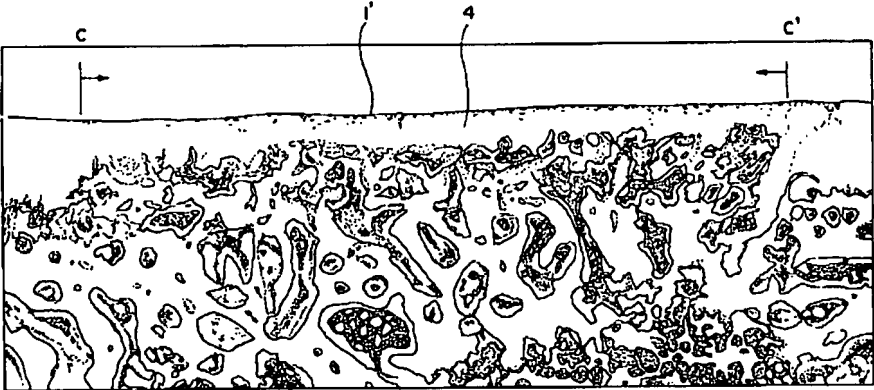
【図2】



【図4】

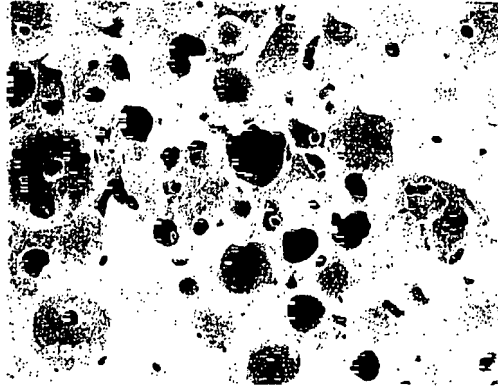


【図3】

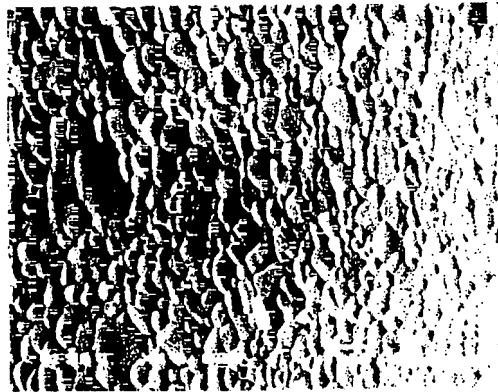


【図5】

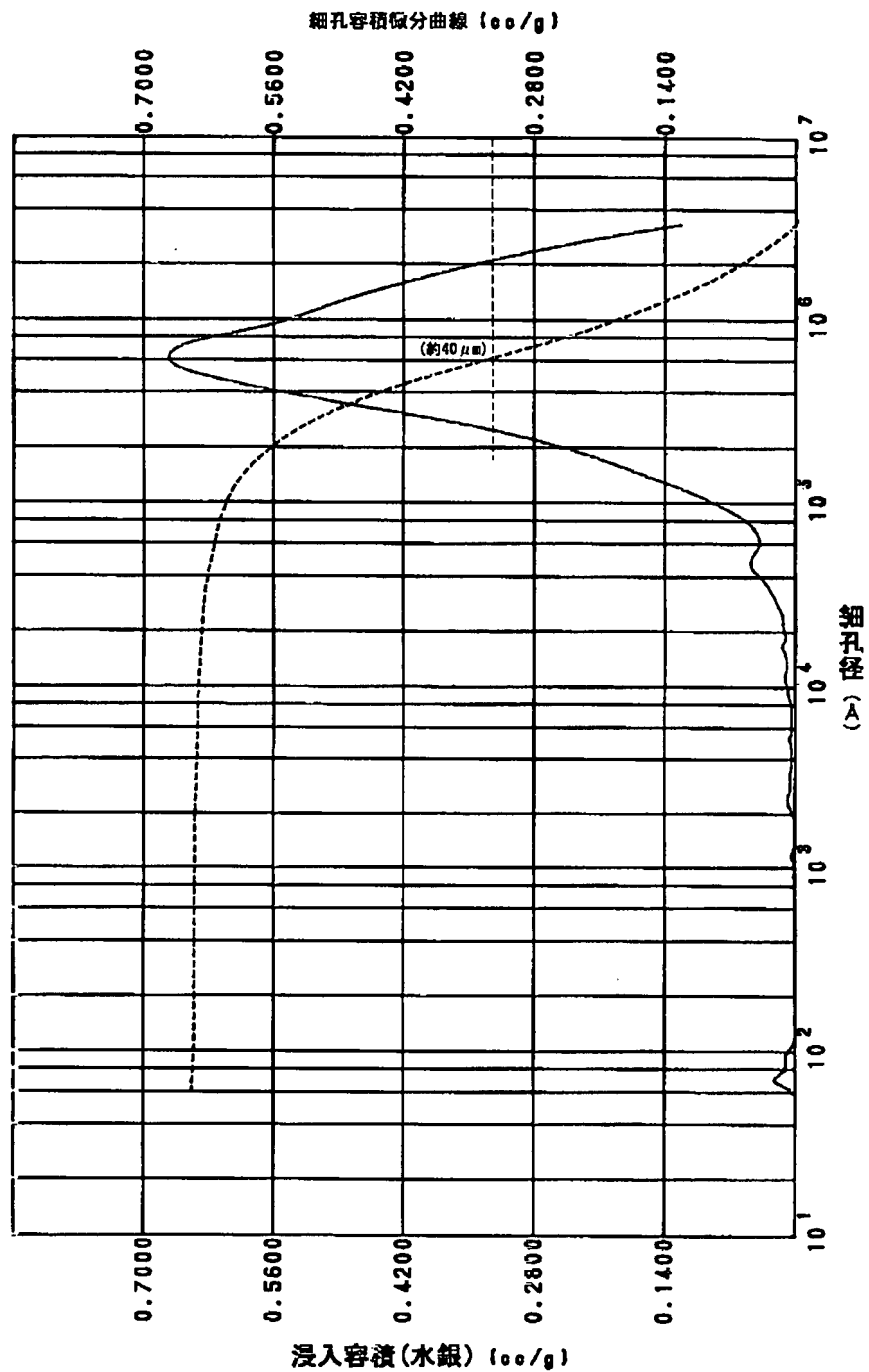
(a)



(b)



【図6】



フロントページの続き

(72)発明者 吉川 秀樹
大阪府豊中市少路2-111-1-605

(註 4) 103-325657 (P2003-325657A)

F ターム(参考) 4C081 AB05 BA12 BA16 CA161
CC02 CD131 CE02 CF021
CF031 CF111 CF121 CF131
CF151 DA11 DA12 DB03
DC14 EA01 EA06